

**Dyslokalisationsmoleküle und deren
Verwendung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Dyslokalisationsmoleküle, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere zur Behandlung von Tumoren.

Die Lokalisation eines Proteins, also der Aufenthaltsort in einer Zelle, in einem Gewebe oder im Plasma hat wesentlichen Einfluss auf die Funktion und Aktivität des Proteins. Dies gilt in besonderem Maße für Proteine, die an der Zellregulation beteiligt sind.

Eukaryonten-Zellen enthalten intrazelluläre Membranen, die nahezu die Hälfte des Zellinhaltes in räumlich getrennte, als Organellen bezeichnete Kompartimente aufteilen. Die Haupttypen der in allen eukaryontischen Zellen vorkommenden membranumschlossenen Organellen sind das Endoplasmatische Reticulum, der Golgi-Apparat, der Zellkern, die Mitochondrien, die Lysosomen, die Endosomen und die Peroxisomen. Jedes Organell besitzt einen bestimmten Satz an

- 2 -

Proteinen, der die Aufrechterhaltung der organellspezifischen Funktionen gewährleistet.

Die neusynthetisierten Proteine finden ihren Weg vom Cytosol, wo sie gebildet werden, zu dem Organell, in dem sie spezifische Aufgaben erfüllen, indem sie einem spezifischen Transportweg folgen. Der Transportweg ist durch Signale in Form von Signalpeptiden oder Signalbereichen in der Aminosäure-Sequenz des Proteins festgelegt. Diese Signalpeptide werden von entsprechenden Rezeptoren des Zielorganells erkannt. Proteine, die ihre Aufgabe im Cytosol erfüllen, enthalten keine Signalpeptide und verbleiben daher im Cytosol (Alberts et al., Molekularbiologie der Zelle; VCH Verlag, 3. Auflage).

Die zielgerichtete Lokalisation der Proteine wird ferner durch deren Organisation als multimere Komplexe erzielt, welche gezielt zu subzellulären Strukturen transportiert werden können. Diese Komplexe werden an entsprechenden Orten durch ihre Affinität gegenüber Anker- oder Scaffold-Proteinen und mittels anderer struktureller Komponenten an diesem Ort gehalten. Die Affinität einzelner Proteine zu diesen Strukturen hängt von entsprechenden Lokalisationsdomänen, post-translationalen Modifikationen, allosterischen Veränderungen und anderen Effekten ab (Stein et al., J.Cell.Biochem., Suppl.(2000), S.84-92).

Die Funktion verschiedener Proteinfamilien, die DNA-bindende und transaktivierende Aktivität aufweisen, wie beispielsweise Catenin, Notch oder STAT-Proteine, hängt essentiell von dem Transport aus dem Cytosol in den Zellkern ab.

In vielen Erkrankungen ergeben sich funktionale Konsequenzen einer Mutation durch veränderte Lokalisation der mutierten Genprodukte. Bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) beispielsweise hängt das transformierende Potential des Bcr-Abl nicht nur von der aktivierten Kinaseaktivität des Abl ab, sondern auch von der ge-

- 3 -

störten, Aktin-gebundenen Lokalisation des Proteins. Aufgrund dieser Lokalisation werden sowohl mitogene als auch anti-apoptotische Signalwege aktiviert, wodurch die transformierende Aktivität erreicht wird (Daley et al., Science, Vol.247 (1990), S.824-830).

Ein nukleärer Einschluß des Bcr-Abl durch unspezifische Hemmung der nukleären Exportmaschinerie führt beispielsweise zur Apoptose der Bcr-Abl positiven Zellen (Vigneri P. & Wang J.Y., Nat.med., Vol.7 (2001), S.228-234).

Bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) ist die maligne Transformation oft mit einer Proteindyslokalisierung verbunden. Die häufigsten chromosomalen Translokationen erzeugen chimäre Proteine, die Transkriptionsfaktoren umfassen, wodurch häufig die DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsaktivators mit einem Transkriptionsrepressor fusioniert wird. Es erfolgt somit ein Fehltransport des Transkriptionsrepressors zu den Zielgenen des Transkriptionsaktivators.

Die häufigste chromosomale Translokation bei der AML ist die t(8;21) Translokation, die in 10-15% der erwachsenen Patienten mit dieser Krankheit gefunden wird (Downing J.R., Br.J. Haematol. Vol. 106 (1999), S.296-308). Aufgrund dieser Translokation wird das C-terminale Ende des Transkriptionsaktivators AML1 durch den Transkriptionsrepressor ETO ersetzt und erzeugt das Fusionsprotein AML1-ETO (Meyers et al., Mol.Cell.Biol., Vol.15 (1995), S.1974-1982; und Lenny et al., Oncogene, Vol.11 (1995), 1761-1769).

Das Fusionsprotein AML1-ETO ist in der Lage, die Bindung verschiedener Co-Repressoren und Histon-Deacetylasen (HDACs) zu bewirken, und auf diese Weise die Expression der AML1 Zielgene, beispielsweise von GM-CSF, der neutrophilen Elastase und c/EBP α , zu inhibieren (Britos-Bray, M. & Friedman, A.D., Mol.Cell.Biol., Vol.17 (1997), S.5127-5135); Frank et al., Oncogene, Vol.11

- 4 -

(1995), S.2667-2674); Pabst, et al., Nat.Med., Vol.7 (2001), S.444-451; und Oelgeschlager et al., Mol.Cell.Biol., Vol.16 (1996), S.4717-25). Es ist davon auszugehen, daß diese Wirkung des AML1-ETO für die für AML typische Blockade der Differenzierung verantwortlich ist.

Tumorerkrankungen werden heute üblicherweise durch eine Kombination aus chirurgischem Eingriff, Bestrahlung und der Verabreichung von Chemotherapeutika behandelt. Bei den hämatologischen Tumorerkrankungen beschränkt sich die Therapie vor allem auf die Verabreichung von Chemotherapeutika. Die klassischen chemotherapeutischen Ansätze wie auch die Bestrahlung wirken jedoch nicht spezifisch auf die Krebszellen. Für den Patienten ist die Therapie daher in jedem Fall mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden, weil die Wirkung des jeweiligen Therapieansatzes alle proliferierenden Zellen trifft.

Die Nebenwirkungen der Chemotherapie können bis zu akutem Nierenversagen und toxisch bedingten Organschädigungen an Herz, Lunge, Leber und Nervensystem führen. Als Folge der immunsuppressiven Wirkung dieser Therapie muß mit einer gehäuften Anzahl von tödlich verlaufenden Infektionen gerechnet werden. Gerade für ältere Patienten kommen viele Therapien wegen ihrer Toxizität nicht in Frage.

Die beschränkte Verfügbarkeit von Wirkstoffen, die spezifisch gegen Krebszellen gerichtet sind und diese angreifen, ist ein wesentlicher Grund für die immer noch sehr schlechte Prognose bei vielen Krebsarten.

Im Stand der Technik wurde daher versucht, Tumorzell-spezifische Therapieansätze zu entwickeln. So wurde ein defizientes Adenovirus konstruiert, das ausschließlich in Tumoren mit Mutationen im p53 Signaltransduktionsweg replizieren kann (Bischoff et al., 1996, Science, Vol.274, S.373-6). Durch dieses Vorgehen werden Tumor-

- 5 -

zellen, welche eine p53 Mutation aufweisen, infiziert, während andere Zellen nicht beeinflusst werden. Der praktische Wert dieser Therapie wird gegenwärtig in klinischen Versuchen untersucht (McCormick F., 2000, Semin.Cancer Biol., Vol.10, S.453-9).

Die meisten Therapieansätze sind jedoch auf die Identifizierung kleiner Moleküle gerichtet, die als Inhibitoren onkogener Proteine verwendet werden könnten, beispielsweise spezifische Inhibitoren der Tyrosinkinasen. STI571, ein Inhibitor verschiedener Tyrosinkinasen, darunter Bcr-Abl, hat sich gegen t(9;22) Leukämien als wirksam erwiesen (Vigneri et al., 2001, Nat.Med., Vol.7, S.228-34). Trotz der Wirksamkeit des STI571 bei der Hemmung der molekularen Ziele in BCR-ABL-assoziierten Erkrankungen wird volle Wirksamkeit nur bei CML-Patienten mit einer frühen (chronischen Phase), aber nicht voll ausgebildeten Erkrankung erreicht. Im Gegensatz dazu ist ein Rückfall bei den meisten Patienten mit Bcr-Abl positiver Akuter Lymphoblastischer Leukämie und CML-Blastenkrise zu beobachten. Der Grund besteht wahrscheinlich darin, daß der Krebs das Ergebnis einer Serie genetischer Veränderungen ist und die Umkehr eines dieser onkogenen Ereignisse durch einen Wirkstoff für die Heilung der Erkrankung nicht ausreichend ist.

Obwohl molekulare Angriffsziele (sogenannte "targets") für eine Krebstherapie mit zunehmender Geschwindigkeit identifiziert werden, sind bislang kaum Ideen entwickelt worden, wie dieses Wissen für spezifische Therapien genutzt werden könnte.

Der vorliegenden Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die als aktiver Wirkstoff eines Arzneimittels eine verbesserte Behandlung von Tumoren, insbesondere von Leukämien ermöglichen.

Diese Aufgabe wurde nunmehr durch Verbindungen gelöst, die Bindungsaffinität für ein Tumor-spezifisches Molekül aufweisen und

- 6 -

eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken können.

Für alle Ausführungsformen der vorliegenden Anmeldung ist es bevorzugt, daß die durch die erfindungsgemäßen Verbindungen bewirkte Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls das Wachstum Tumor-spezifischer Zellen inhibiert oder sogar in Tumor-spezifischen Zellen Apoptose induziert.

Im Gegensatz zu den Therapieansätzen aus dem Stand der Technik richtet sich der Therapieansatz der vorliegenden Erfindung somit auf eine Dyslokalisation eines onkogenen Moleküls, bei dem die Funktion des Onkogens nicht inhibiert, sondern zur Eliminierung der Onkogen-enthaltenden Zellen genutzt wird. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind hoch spezifisch und haben keinerlei Wirkung auf Zellen, die das Tumor-spezifische Molekül nicht aufweisen. Dieser neue Therapieansatz kehrt deshalb nicht einzelne onkogene Ereignisse um, sondern verändert eine spezifische Eigenschaft der Tumorzellen in einer solchen Weise, daß die Tumorzelle eliminiert wird. Hierbei nutzt diese Methode die Tatsache, dass die Funktion vieler Proteine - auch der onkogenen Proteine - nicht nur von ihrer Form, sondern auch ganz entscheidend von ihrer Lokalisation in der Zelle abhängt.

Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der Verbindung um ein Peptid, Oligopeptid, Protein oder Fusionsprotein. Es ist aber ebenfalls möglich, kleine Moleküle einzusetzen, die durch ihre spezifische Bindung an das Tumor-spezifische Molekül charakterisiert sind. Eine Vielzahl organischer Moleküle ist hierbei einsetzbar. Als organische Moleküle werden vorliegend Kohlenwasserstoffe von geringem Molekulargewicht verstanden. Diese können ein Molekulargewicht von <5000 Da, vorzugsweise <1000 Da und besonders bevorzugt <500 Da aufweisen. Ebenso ist es denkbar, zusammengefügte Moleküle zu verwenden, die aus zwei unterschiedlichen Komponenten bestehen.

Das Tumor-spezifische Molekül ist ein Molekül, das in dieser Form entweder ausschließlich in Tumorzellen vorliegt oder in Tumorzellen in einer anderen Konzentration als in gesunden Zellen vorliegt. Vorzugsweise handelt es sich auch bei dem Tumor-spezifischen Molekül um ein Peptid, Oligopeptid, Protein, Fusionsprotein, RNA oder DNA. Hierbei sind auch tumorspezifische posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung, Acetylierung, Methylierung und ähnliche Modifikationen als Tumor-spezifische Parameter möglich.

Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei dem Tumor-spezifischen Molekül um ein Fusionsprotein, welches ausschließlich in Tumorzellen vorliegt, beispielsweise das Molekül AML1-ETO. Weiter angreifbare Tumor-spezifische Moleküle sind die aus anderen chromosomalen Translokationen entstehenden Fusionsproteine bei Leukämien (Bcr-Abl, PML-RARalpha, PLZF-RARalpha, MLL-Fusionsproteine, etc.) sowie bei anderen malignen Erkrankungen (z.b. EWS-Fli bei Sarkomen).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen eine Bindungsaffinität für die Tumor-spezifischen Moleküle auf. Die Bindungsaffinität liegt vorzugsweise im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-12} , und besonders bevorzugt im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-9} .

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind in der Lage, eine Dyslokalisation der Tumor-spezifischen Moleküle zu bewirken. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter einer Dyslokalisation eines Tumor-spezifischen Moleküls der Transport des Moleküls innerhalb der Zelle oder des Gewebes an einen Ort verstanden, an dem dieses Molekül in Tumorzellen üblicherweise nicht vorliegt. Beispielsweise kann eine Dyslokalisation eine Bindung Tumor-spezifischer Proteine (beispielsweise Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren) an die genomische DNA an Positionen bewirken, an denen die Tumor-spezifischen Proteine sonst nicht binden würden.

Gemäß eines anderen Beispiels kann die Dyslokalisation eines Tumor-spezifischen Moleküls zur Folge haben, daß dieses sezerniert oder in ein Zellorganell transportiert wird, obwohl es in der Tumorzelle ein cytoplasmatisches Molekül ist. Das Tumor-spezifische Molekül kann beispielsweise aus dem Nukleus exportiert werden, obwohl es in Tumorzellen ein nukleäres Molekül ist.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung führt die Dyslokation des Tumor-spezifischen Moleküls zu einer mehr als 60%igen Inhibierung des Wachstums der Tumorzellen, wobei eine mehr als 80%ige Inhibierung besonders bevorzugt ist. Die Wachstumsinhibition kann über eine Verringerung der Kolonien-Bildung in Methylzellulose nach dem Verfahren von Mizuki, M. et al. "Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways", Blood, 2000 Dec 1, Vol. 96(12), 3907-14, bestimmt werden.

Gemäß einer alternativen Ausführungsform führt die Dyslokalisation zu einer Induktion von Apoptose in den Tumorzellen. Die Apoptose in den Tumorzellen ist dabei in Zellen, welche mit dem erfindungsgemäßen Molekül behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Zellen vorzugsweise um den Faktor 2 erhöht, wobei eine Steigerung der Apoptose um mindestens den Faktor 3 besonders bevorzugt ist. Die gesteigerte Induktion der Apoptose in den Tumorzellen kann mittels Standardassays gemessen werden (Darzynkiewicz, Z. et al., "Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis", Semin Hematol. 2001 Apr, Vol.38(2), 179-93).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls beispielsweise zur Bindung des Tumor-spezifischen Moleküls an eine Nukleinsäuresequenz führen, welche die Transkription eines Gens reguliert. Durch die Bindung des Tumor-spezifischen Moleküls kann die Transkription des Gens

aktiviert oder inhibiert werden.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Verbindung die Peptidsequenz der c-myc DNA-Bindungsdomäne und/oder die Peptidsequenz der AML1-Bindungsdomäne des MEF ("myeloid elf like factor"). Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Verbindung die in SEQ ID NO:1 gezeigte Aminosäuresequenz auf.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, die für ein erfindungsgemäßes Peptid oder Protein kodieren, das Bindungsaffinität für ein Tumor-spezifisches Molekül aufweist und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann. Bei der Nukleinsäure handelt es sich vorzugsweise um DNA oder RNA. Die Nukleinsäure kann Teil eines Vektors sein, der für eine Expression der Nukleinsäure ausgelegt sein kann. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Verbindung von der in SEQ ID NO:2 gezeigten Nukleotidsequenz kodiert.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Wirts-Zellen, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren aufweisen.

Die Erfindung umfaßt ferner Arzneimittel, welche eine erfindungsgemäße Verbindung, Nukleinsäure oder Wirts-Zellen umfassen. Das Arzneimittel kann ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen und zur oralen, intravenösen oder intramuskulären Verabreichung formuliert sein.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung, Nukleinsäuren oder Wirts-Zellen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren, Leukämien, insbesondere der Akuten Myeloischen Leukämie. Die Behandlung einer Akuten Myeloischen Leukämie, die durch eine

t(8;21) Translokation verursacht wurde, ist besonders bevorzugt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind ferner Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen umfaßt. Soweit es sich dabei um ein Peptid oder Protein handelt, kann dieses rekombinant exprimiert oder durch Proteinsynthese gewonnen werden.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, die zur Behandlung von Tumoren geeignet ist, bei denen man:

- (a) ein Tumor-spezifisches Molekül identifiziert; und
- (b) eine Verbindung identifiziert, die eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und eine Dyslokation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann.

Tumorspezifische Moleküle werden bei diesem Verfahren mittels moderner Genomik- und Proteomik-Verfahren identifiziert. Hierbei können zum Beispiel Microarray-Analysen oder 2D-Proteingelelektrophoresen mit nachfolgender massenspektrometrischer Identifizierung sowie eine Kombination dieser Verfahren eingesetzt werden.

Alle im Stand der Technik bekannten Verfahren zur Analyse von Unterschieden zwischen Tumorzellen und nicht-entarteten Zellen können erfindungsgemäß zur Identifizierung Tumor-spezifischer Moleküle verwandt werden.

In einem zweiten Schritt wird das Zielmolekül identifiziert, das zur Dyslokation des Tumor-spezifischen Moleküls benutzt werden kann. Hierbei kann es sich wiederum um ein Protein, eine RNA oder ein DNA-Fragment handeln.

- 11 -

Das Screening-Verfahren wird vorzugsweise als Hochdurchsatzverfahren so angewandt, daß mittels automatischer Pipettierroboter tausende von Substanzen auf ihre Bindung an das Tumor-spezifische Molekül und an das Dyslokalisationsmolekül getestet werden. Ausgewählt werden dann Verbindungen, die jeweils mit hoher Affinität und Spezifität an eines der beiden Moleküle oder an beide zugleich binden. Werden zwei unterschiedliche Moleküle identifiziert (wobei eines an das Tumor-spezifische Molekül bindet und das andere die Dyslokalisation auslöst), so werden diese Moleküle durch chemische Verfahren, z.B. durch das Einführen eines Polylinkers gekoppelt. Ein großer Vorteil dieses Screeningverfahrens liegt darin, daß jedes Molekül nur an das Zielmolekül binden muß, aber nicht notwendigerweise auch die Funktion des Zielmoleküls beeinflussen muß.

In den nachfolgenden Beispielen wurde ein rekombinantes Fusionsprotein erzeugt, um die AML1-ETO-Repressoraktivität auf Promotoren zu richten, die für das Überleben und die Proliferation myeloischer Zellen essentiell sind. Ein hohes Maß an Spezifität wurde durch verschiedene Effekte erreicht. Die c-myb Bindungsstellen wurden als Ziel für GFP-M&M und AML1-ETO Repressorkomplexe genutzt. C-myb ist für hämatopoetische Zellen essentiell, jedoch nicht für die Entwicklung anderer Organe (Mucenski, 1991, Cell Vol.65, S.677-89).

Die essentielle Bedeutung des c-myb für Zellproliferationen leukämischer Zellen ist allgemein bekannt. Die Hemmung myb-abhängiger Gene stellt ein wesentliches Ziel der Leukämietherapie dar (Mucenski, 1991, Cell Vol.65, S.677-89; Ratajczak, 1992, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.89, S.118237; Gewirtz et al., 1988, Science, Vol.242, S.1303-6; Gewirtz A.M., 1999, Oncogene, Vol.18, 3056-62).

Die Experimente zeigen, daß das erfindungsgemäße Dyslokalisationsmolekül (hier ein rekombinantes Fusionsprotein) gegenüber

- 12 -

Zellen, welche AML1-ETO nicht exprimieren, nicht toxisch ist. Eine hohe spezifische Toxizität wurde für Zellen erzielt, die tumorinduzierende Transformationen erlitten hatten.

Beschreibung der Figuren

- Figur 1:** Konstruktion eines AML1-ETO Dyslokalisationsproteins
- a Hypothese der Funktion eines chimären Proteins bestehend aus der DNA Bindungsdomäne von c-myb und der AML1 Bindungsdomäne von MEF.
 - b Struktur des chimären Proteins und der Deletionsmutante.
 - c Immunoblot-Nachweis aus Cos7-Zell-Lysaten mit einem Anti-GFP-Antikörper nach Transfektion der Zellen mit GFP, GFP-ΔM&M und GFP-M&M.
- Figur 2:** Spezifische Bindung des GFP-M&M an myb Bindungsstellen und Bindung von AML1-ETO in vitro. Zellkernextrakte von Cos7-Zellen, die mit c-myb GFP-M&M und AML1-ETO transfiziert worden waren, wurden in "Elektrophoretischen Mobilitäts Shift Assays" (EMSA) analysiert. Kompetitions-Experimente mit spezifischen myb und unspezifischen Oligonukleotiden zeigen die Spezifität der GFP-M&M Bindung. Der Supershift von M&M, der durch die Kotransfektion von GFP-M&M mit AML1-ETO entsteht, zeigt die Dyslokalisation von AML1-ETO zu den myb Bindungsstellen.
- Figur 3:** Bindung des AML1-ETO an den endogenen c-kit Promotor mittels GFP-M&M. KCL22 Zellen wurden mit FLAG-AML1-ETO und GFP oder GFP-M&M transfiziert, DNA-

- 13 -

bindende Proteine wurden mit Hilfe von Formaldehyd fest an DNA gekoppelt, die Zellen lysiert, die DNA fragmentiert und mit anti-FLAG oder unspezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Im immunpräzipitierten Chromatin wurden die Promotor-Sequenzen von c-kit und $pl4^{ARF}$ mit einer PCR detektiert. Ein repräsentatives von zwei Experimenten wird gezeigt.

Figur 4:

Spezifische Repression des myb-abhängigen Promotors durch GFP-M&M in Anwesenheit von AML1-ETO. KCL22-Zellen wurden transient mit einem myb abhängigen Luciferase-Konstrukt und c-myb, AML1, AML1-ETO, GFP-ΔM&M und GFP-M&M (wie angezeigt) transfiziert. Der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Figur 5:

GFP-M&M reprimiert Koloniewachstum in AML1-ETO exprimierenden Zellen.

- a 32D Zellen wurden mit GFP als Kontrolle oder AML1-ETO und GFP-M&M wie angegeben transfiziert und 1×10^5 Zellen in Kolonienachweisverfahren ausgesiedelt. Die Photos zeigen repräsentative Kolonien an Tag 10.
- b 32D Zellen wurden wie angegeben transfiziert und im Kolonie-Nachweisverfahren ausgesiedelt. An Tag 10 wurden die Kolonien gezählt. Hier ist die Repression des Koloniewachstums verglichen mit der Kontrolltransfektion mit GFP (als 1 gesetzt) dargestellt. Der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Versuchen wird gezeigt.
- c AML1-ETO wurde alleine oder in Kombination mit GFP-

- 14 -

M&M oder GFP-ΔM&M in 32D-Zellen transfiziert und anschließend für Kolonienachweisverfahren ausgesiedelt. Der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

- d GFP oder GFP-M&M wurden in Kasumi-1-Zellen transfiziert, die natürlicherweise AML1-ETO exprimieren und in Kolonienachweisverfahren ausgesiedelt. Der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Figur 6:

GFP-M&M induziert in AML1-ETO exprimierenden Zellen Apoptose. 32D Zellen wurden mit AML1-ETO, GFP-M&M oder beiden Vektoren transfiziert und anschließend wurden die transfizierten Zellen durch Durchflußzytometrie sortiert. Die transfizierten Zellen wurden dann in einem TUNEL-Nachweisverfahren analysiert.

- a Darstellung der FACS Ergebnisse für BrdU-positive, apoptotische Zellen. Die offenen Kurven stellen die Apoptoserate in Zellen, die zu Kontrollzwecken mit einem Leervektor transfiziert wurden, dar.
- b Dargestellung der Anteile von apoptotischen Zellen in den transfizierten 32D Zellen.

Figur 7:

In Zellen ohne AML1-ETO werden MYB-abhängige Promotoren in vivo nicht von GFP-M&M reprimiert. Primäre murine Knochenmarkzellen wurden mit GFP oder GFP-M&M transduziert. Anschließend wurde die Expression von KIT in den GFP-positiven Zellen analysiert. Die Ergebnisse eines von zwei unabhängigen Experimenten werden gezeigt.

Materialien und Methoden

In den Beispielen wurden die folgenden Materialien und Methoden verwendet:

1. Plasmide:

Das GFP-M&M Expressionsplasmid in pCDNA3.1 wurde mittels PFU-Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung eines murinen c-myb Expressionsplasmides und von cDNA aus KCL22 Zellen als Template hergestellt, wobei spezifische Primer für die DNA-Bindungsdomäne von c-myb (kodiert von den Nukleotiden 193-594 der SEQ ID NO:13; umfassend die Restriktionsschnittstellen für KpnI und BamHI) und die AML1 Bindungsdomäne von MEF (kodiert von den Nukleotiden 251-618 der SEQ ID:12; umfassend Restriktionsschnittstellen für BamHI und EcoRI) verwendet wurden. Die PCR Produkte wurden in Leserichtung in GFP-pCDNA3.1 (GFP entspricht den Nukleotiden 91-813 von SEQ ID NO:11) kloniert. GFPAM&M wurde entsprechend kloniert, wobei ein PCR Fragment verwendet wurde, welchem die ersten 159 Basenpaare der DNA-Bindungsdomäne des c-Myb fehlten.

Primer für die AML1 Bindungsdomäne von MEF:

MEF-BamHI for: 5'- ATA GGA TCC GCC ACC TCG CAC ACC ATG TCA-3' (SEQ ID NO: 3)

MEF-EcoRI rev: 5'- CAG AAT TCG CCT TTG CCA TCC TTT GAT TTC-3' (SEQ ID NO: 4)

Primer für die DNA-Bindungsdomäne von c-myb:

myb-KpnI for: 5'- CAG AGA GGT ACC GTC ATT GCC AAT TAT CTG-3' (SEQ ID NO: 5)

myb-BamHI rev: 5'- CAG AGA GGA TCC GTA GCC TTC CTG TTC CAC-3' (SEQ ID NO: 6)

- 16 -

Das myb-TK (Thymidinkinase) Luziferasekonstrukt war ein Geschenk von Prof. Dr. Klempnauer. Die AML1-ETO cDNA wurde in pcDNA3.1 subkloniert.

2. Zelllinien und Transfektion:

Die IL-3-abhängige murine myeloische Zelllinie 32Dcl3, die humanen myeloischen Zelllinien KCl22 und Kasumi-1, sowie die Affennieren Zelllinie Cos7 wurden nach im Stand der Technik bekannten Verfahren kultiviert. 32Dcl3 Zellen und KCl22 Zellen wurden durch Elektroporation mit 15 µg Plasmid DNA transfiziert und Cos-Zellen wurden unter Verwendung von Lipofectamin (Invitrogen) mit 5 µg Plasmid DNA transfiziert.

3. Immunoblotting:

Aus den mit den Expressionsvektoren für GFP, GFP-M&M oder GFP-AM&M transfizierten Cos-Zellen wurden Proteinlysate hergestellt. Die drei Proteine wurden unter Verwendung des monoklonalen murinen GFP-Antikörpers (Clonotech, Heidelberg, Deutschland) nachgewiesen, wobei der Nachweis durch eine Inkubation mit Radieschen-Peroxidase konjugiertem sekundärem IgG-Antikörper gegen Maus IgG erfolgte (Jackson ImmunoResearch).

4. Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay

Cos7-Zellen wurden mit einer Gesamtmenge von 5 µg der Expressionsvektoren für c-myb, AML1-ETO, GFP und GFP-M&M in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Die Herstellung von Zellkernextrakten der transfizierten Cos7-Zellen, die Bindungsreaktion und die Oligonukleotide, welche die c-myb Konsensus-Bindungssequenz aufweisen, sind in Müller et al., 1999, Blood, Vol.94, S. 4255-62, beschrieben. Für die kompetitiven Experimente wurden 100 ng doppelsträngiger Oligonukleotide verwendet, die entweder die myb Konsensusstelle oder eine unspezifische Bindungsstelle aufwiesen.

5. Chromatin Immunopräzipitation:

KCL22 Zellen wurden mit FLAG AML1-ETO und GFP oder GFP-M&M transfiziert. 12 Stunden nach der Transfektion wurden durch Zugabe von 1% Formaldehyd für 10 Minuten die zellulären Proteine an die DNA gebunden und anschließend die Reaktion durch die Zugabe von 0,125 M Glycin beendet. Die Zellen wurden zweimal in eiskaltem PBS gewaschen und in 1ml RIPA Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren, 200 µM Natrium Orthovanadat und 50 µM NaF lysiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Chromatin mit Hilfe von UV-Strahlen fragmentiert (9 Pulse von 5 Sekunden). Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation abgetrennt und 50 µl wurden als "input"-Kontrolle aufbewahrt. Der Rest des Lysates wurde in 40 µl Protein A/G-Agarose mit 5 µg Kaninchen- und Maus-IgG vorgereinigt. Der Rest jedes Lysates wurde in zwei Proben aufgeteilt und die Immunopräzipitation wurde entweder unter Verwendung von 3 µg eines anti-FLAG oder Maus-IgG mit 40 µl Protein A/G-Agarose über Nacht durchgeführt. Die Immunkomplexe wurden achtfach in einem Puffer mit geringem Salzgehalt gewaschen (0,1% SDS, 150 µM NaCl, 1% Triton X-100, 2 µM EDTA, pH 8,0, 20 µM Tris-HCl, pH 8,1). Anschließend wurden die Verbindungen zwischen der DNA und den Proteinen in den Immunkomplexen und der "input"-Kontrolle wieder gelöst und die DNA aus der Lösung Phenol/Chloroform extrahiert. Dann wurden in den Proben spezifische Promotor-Sequenzen für die c-kit Promotor Region und die p14^{ARF} Promotor Region mittels PCR detektiert.

Die PCR wurde mit einer Taq-Polymerase (Promega) auf einem Mastercycler (Eppendorf) durchgeführt (95°C für 3 Min., 37 Cyclen bei 95°C für 1 Min., 60°C für 1 Min. und 72°C für 1 Min.). Die Produkte wurden auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

- 18 -

Primer für die pl4^{ARF} Promoter Region:

pl4^{ARF} for: 5'-AGT GGC TAC GTA AGA GTG ATC GC-3' (SEQ ID NO: 7)
pl4^{ARF} rev: 5'-CTT ACA GAT CAG ACG TCA AGC CC -3' (SEQ ID NO: 8)

Primer für die c-kit Promoter Region:

c-kit for: 5'- ACT GTT GTT GCT TTC CGT TCA A-3'
(SEQ ID NO: 9)
c-kit rev: 5'- TTA AGC CCG ATT TCA CTG CC-3'
(SEQ ID NO: 10)

6. Luziferase-Nachweis:

Der Nachweis der Promotoraktivität erfolgte nach im Stand der Technik bekannten Verfahren (Müller et al., 2000, Mol.Cell.Biol., Vol.20, S. 3316-29). Dabei wird eine Gesamtmenge von 15,5 µg Plasmid mittels Elektrophorese transfiziert. Die Mischung bestand aus 5 µg eines myb-TK Luziferasekonstruktes, 0,5 µg PRL-null Plasmid (Promega, Madison, WI) zur internen Standardisierung und 5 µg der Expressionsvektoren für AML1, AML1-ETO, GFP-ΔM&M und GFP-M&M in verschiedenen Kombinationen. Leervektor wurde zum Ausgleich der Gesamtmenge an transfizierter DNA mittransfiziert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Firefly- und Renilla-Luziferase unter Verwendung des "Dual Luciferase Assay Systems" der Firma Promega detektiert. Die Renilla-Luziferase Aktivität wurde zur internen Standardisierung der Transfektionseffizienz benutzt. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden die Mittelwerte und Standardfehler berechnet.

7. Klonales Wachstum in Methylzellulose:

32Dcl3 Zellen und Kasumi Zellen wurden transient mit einer

- 19 -

Gesamtmenge von 15 g der Expressionsvektoren für AML1, AML1-ETO, GFP, GFP-M&M und GFP M&M in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Um das klonale Wachstum zu untersuchen, wurden die transfizierten Zellen am Tag nach der Elektroporation über eine Gradienten-Zentrifugation separiert und in einer Konzentration von 1×10^5 lebenden Zellen pro 35 mm Platte in 1 ml eines Kultur-Mixes ausgesiedelt. Dieser Mix bestand aus "Isocove modifiziertes Dulbecco Medium" (IMDM, Life Technologies, Grand Island, N.Y.), 1% Methylzellulose, 20% FCS, IL-3 (1ng/ml) und 0,6 mg/dl G418. Alle Versuche wurden dreifach angesetzt und die Kolonien am Tag 10 gezählt. Aus drei unabhängigen Experimenten (für die Kasumi Zellen zwei Experimente) wurden Mittelwerte und Standardfehler berechnet.

8. Apoptoseassay:

32Dcl3 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für GFP, GFP-M&M und AML1-ETO in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die GFP-positiven Zellen mittels Durchflußzytometrie aus den gesamten Zellen herausortiert und weiter untersucht. Der Prozentsatz der apoptotischen Zellen innerhalb der GFP positiven Zellen wurde mittels eines TUNEL Assays (APO-BrdU Kit der Firma Pharmigen) bestimmt, wobei die Experimente nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt wurden. Die Ergebnisse von einem der drei unabhängigen Experimente mit ähnlichen Ergebnissen werden gezeigt.

9. Retrovirale Transduktion von primären Knochenmarkzellen:

Aus den Femura sechs Monate alter BALB/c-Mäusen wurden Knochenmarkzellen entnommen und in RPMI1640-Medium unter Zugabe von murinem IL-3 kultiviert. Phoenix-Zellen wurden mit Hilfe von Lipofectamin Plus (Invitrogen) transient mit GFP oder GFP-M&M in MSCV2.2 transfiziert. Nach 24 Stunden wurde

- 20 -

das Medium gewechselt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Überstände geerntet, gefiltert (0.45µm) und nach Hinzufügen von 4µg/ml Polybrene zu den Knochenmarkzellen gegeben. Dann wurden die Zellen 45 min bei 2000g zentrifugiert und 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend ein zweites Mal wie beschrieben transduziert. Zwei weitere Runden der Transduktion erfolgten am nächsten Tag.

24 Stunden nach dem Ende der Transduktion wurde in den Zellen mit Hilfe der Durchflussszytometrie die Expression von GFP und KIT (anti-CD117-PE von PharMingen) und die Apoptose mit Annexin V-PE (PharMingen) gemäß der Protokolle des Herstellers untersucht.

Beispiel 1 Klonierung des GFP-M&M und Expression in Cos-Zellen

Ein Fusionsprotein aus dem "enhanced green fluorescent protein" (GFP, für Nachweiszwecke; kodiert von den Nukleotiden 91-813 der SEQ ID NO:11), der DNA Bindungsdomäne des murinen c-myb (die Nukleotide 193-594 der SEQ ID NO:13 kodieren für die Aminosäurereste 65-198 des murinen c-myb; vgl. Sakura et al., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.86, S. 5758-61) und der AML1-Bindungsdomäne des humanen Myeloid elf like Faktors, MEF (die Nukleotide 251-618 der SEQ ID:12 kodieren für die Aminosäurereste 87-206 des humanen MEF; vgl. Mao S. et al., 1999, Mol.Cell.Biol., Vol.19, S.3635-44)) wurde konstruiert.

Der Transkriptionsfaktor c-myb ist dafür bekannt, daß er für eine normale Hämatopoese und das Überleben der hämatopoetischen Zellen essentiell ist (Mucenski et al., 1991, Cell, Vol.65, S.677-89). Es konnte gezeigt werden, daß die Hemmung des c-myb durch Antisense-Strategien oder c-myb Knock out Mäuse nicht in der Lage sind, eine

- 21 -

normale Hämatopoese auszubilden (Ratajczak et al., 1992, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.89, S.11823-7).

Als zweiter Teil des chimären Proteins wurde die AML1 Bindungsdomäne des MEF (Myeloid like ELF factor) verwendet. Die Aminosäuren 87-206 des MEF binden stark an AML1 und AML1-ETO in vivo und in vitro (Mao S. et al., 1999, Mol.Cell.Biol., Vol.19, S.3635-44). Alle drei Domänen wurden in Leserichtung in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Dieses Konstrukt wurde als GFP-M&M bezeichnet (Figur 1b). Für Kontrollzwecke wurde eine Deletionsmutante, welche die ersten 53 Aminosäuren der DNA Bindungsdomäne des c-myb nicht aufweist, hergestellt. Die Deletionsmutante wurde als GFP- M&M bezeichnet.

Die Expression der rekombinanten Proteine wurde nach transienter Transfektion in Cos7-Zellen mittels Immunoblot-Nachweisverfahren unter Verwendung von Anti-GFP-Antikörper analysiert (GFP alleine 35 kDa, GFP- M&M 80 kDa; GFP-M&M 85 kDa; Fig. 1c).

Beispiel 2 Analyse der Bindung von GFP-M&M an myb Bindungsstellen

Um die Interaktion des GFP-M&M mit myb DNA Bindungsstellen zu analysieren, wurden elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Assays durchgeführt (vgl. Figur 2). Dafür wurden nukleäre Extrakte transient transfizierter Cos7-Zellen hergestellt. Ein doppelsträngiges myb-Consensus Oligonucleotid diente als Ziel-DNA. Diese Experimente zeigten, daß GFP-M&M ähnlich wie c-myb spezifisch an myb DNA-Bindungsstellen bindet. AML1-ETO alleine wies keine Bindung an die myb-Bindungsstellen auf, aber GFP-M&M führte zu einer Bindung von AML1-ETO an die DNA. Dies resultierte in einem Supershift des Komplexes bestehend aus DNA, GFP-M&M und AML1-ETO (Fig.2).

Beispiel 3 GFP-M&M bindet AML1-ETO an den endogenen c-Kit

Promotor

Die Bindung des GFP-M&M und die Bindung von AML1-ETO an endogene c-myb Ziel-Promotoren wurde unter Verwendung eines Chromatin Immunpräzipitations-Nachweisverfahrens (ChIP) in KCL22 Zellen analysiert.

Als c-myb abhängiger endogener Promotor wurde der c-kit Promotor gewählt. Als Positivkontrolle wurde die nachgewiesene Bindung von AML1-ETO an den p14^{ARF} Promotor analysiert (Linggi et al., Nature Medicine, 8 (7), Juli 2002)). Eine mit FLAG markierte Form des AML1-ETO wurde in Kombination mit GFP oder GFP-M&M in KCL22 Zellen exprimiert. Die Transkriptionsfaktoren wurden mit DNA unter Verwendung von Formaldehyd vernetzt. Nach Zell-Lyse und DNA Fragmentierung wurden DNA/AML1-ETO Komplexe unter Verwendung eines anti-FLAG-Antikörpers oder für Kontrollzwecke unspezifischer Antikörper immunpräzipitiert. Die Vernetzung wurde aufgehoben und die Gegenwart der c-kit- und p14^{ARF}-Promotor DNA Sequenz wurde mittels PCR analysiert. Die Sequenz des c-kit Promotors war in den ChIP-Proben der KCL22 Zellen, die mit AML-ETO und GFP transfiziert worden waren, nicht nachweisbar.

In Gegenwart des GFP-M&M wurden jedoch die c-kit Promotor-Sequenzen mit AML1-ETO immunpräzipitiert (Fig.3). Im Gegensatz dazu wurde die p14^{ARF} Promotorsequenz in Immunkomplexen aus KCL22 Zellen nachgewiesen, die mit AML1-ETO und GFP transfiziert worden waren. Die Sequenz wurde nicht in Gegenwart von AML1-ETO und GFP-M&M nachgewiesen (Fig.3).

Diese Ergebnisse zeigen, daß GFP-M&M AML1-ETO an den endogenen c-myb abhängigen Promotor c-kit in vivo binden kann.

Beispiel 4 Hemmung von myb abhängigen Promotoren in Gegenwart von GFP-M&M und AML1-ETO

- 23 -

GFP-M&M bindet an myb abhängige Promotoren, bildet mit AML1-ETO (soweit vorhanden) einen Komplex und inhibiert dadurch die Genexpression.

Als weiterer Nachweis wurden Luziferase-Assays durchgeführt, wobei das Luziferase-Gen unter der Kontrolle eines minimalen Thymidin-Kinase-Promotors mit drei zusätzlichen myb DNA-Bindungsstellen stand (Ziebold et al., 1997, Curr.Biol., Vol.7, S. 253-60). KCL22 Zellen wurden mit den Reporterkonstrukten und GFP, GFP-M&M und AML1-ETO in verschiedenen Kombinationen transfiziert (Fig.4). Keines der Proteine war alleine in der Lage, die Luziferase-Aktivität wesentlich zu beeinflussen. Zellen, die GFP-M&M und AML1-ETO zusammen exprimieren, zeigten jedoch eine mehr als 5-fache Hemmung der Promotor-Aktivität (Fig.4). Anschließend wurde analysiert, ob die funktionale Interaktion zwischen GFP-M&M und myb DNA Bindungsstellen für die Hemmung der Luziferase-Aktivität mittels GFP-M&M in AML1-ETO positiven Zellen notwendig war. Die Mutation der DNA Bindungsstelle in GFP- Δ M&M hemmt die DNA Bindung des rekombinanten Proteins, wobei jedoch die Expression des Proteins nicht verändert wird (Figur 1b). Weder die Expression von GFP- Δ M&M alleine, noch die Expression von GFP- Δ M&M und AML1-ETO zusammen hemmten die Luziferase-Aktivität.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die GFP-M&M Bindung an die DNA für die Repression des myb abhängigen Gens in Gegenwart von AML1-ETO notwendig ist (Fig.4).

Beispiel 5 Hemmung des Koloniewachstums durch GFP-M&M in AML1-ETO exprimierenden Zellen

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors Myb und die Expression der myb abhängigen Gene sind für das Wachstum und die Proliferation hämatopoetischer Zellen essentiell (White et al., 2000, Oncogene,

- 24 -

Vol.19, S.1196-205). Daher wurde die Wirkung von GFP-M&M auf die Proliferation und Überlebensrate der AML1-ETO enthaltenden Zellen analysiert.

Zunächst wurde die Fähigkeit der transfizierten hämatopoetischen 32D Zellen zur Kolonienbildung untersucht. Das Koloniewachstum wurde in Zellen, die mit AML1, GFP-M&M oder AML1 und GFP-M&M transfiziert worden waren, nicht gehemmt.

Zellen, die mit AML1-ETO alleine transfiziert worden waren, zeigten eine sechsfache Hemmung des Koloniewachstums, welche wahrscheinlich auf den toxischen Effekt des AML1-ETO selbst zurückzuführen ist (Muller et al., Mol.Cell.Bio., 2000, Vol.20., S.3316-29). Transfektion der 32D Zellen mit GFP-M&M in Gegenwart von AML1-ETO reduzierte jedoch das Wachstum der Kolonien etwa um das 60fache (Figur 5a und b). Im Vergleich zu GFP-M&M und GFP-ΔM&M in Kolonie-Assays wurde festgestellt, daß eine gemeinsame Expression von GFP-M&M und AML1-ETO die relative Anzahl der Kolonien um mehr als 80% reduzierte. Im Gegensatz dazu inhibierten GFP-ΔM&M und AML1-ETO nicht das Koloniewachstum (Fig.5c). Die letztere Beobachtung zeigt, daß eine funktionale Interaktion zwischen GFP-M&M und myb DNA-Bindungsstellen für die Hemmung des Koloniewachstums in AML1-ETO positiven Zellen notwendig ist.

Neben den Wirkungen von GFP-M&M in AML1-ETO transfizierten Zellen wurde auch die Aktivität von GFP-M&M in t(8;21) positiven Kasumi-1 Leukämiezellen untersucht. Das Koloniewachstum wurde nach Transfektion mittels GFP-M&M im Vergleich zu Zellen, die mit GFP-pcDNA3.1 alleine (Kontrolle) transfiziert worden waren, um das 12fache reduziert (Fig.5d).

Beispiel 6

Induktion der Apoptose durch GFP-M&M in AML1-ETO enthaltenden Zellen

- 25 -

Hämatopoetische Zellen, die keine c-myb Aktivität aufweisen, unterliegen der Apoptose (Taylor et al., 1996, Genes Dev., Vol.10, S.2732-44).

Um die Wirkung von GFP-M&M in AML1-ETO positiven Zellen und deren Einfluß auf die Apoptose zu untersuchen, wurde die Gegenwart von DNA Strangbrüchen mittels TUNEL-Assay untersucht. 32D-Zellen wurden mit GFP, AML1-ETO oder GFP-M&M oder mit einer Kombination aus AML1-ETO und GFP-M&M transfiziert. Nach 24 Stunden befanden sich etwa 10% der Zellen, die GFP, AML1-ETO oder GFP-M&M allein exprimieren, in Apoptose. Im Gegensatz dazu betrug der Prozentsatz apoptotischer Zellen unter den Zellen, die sowohl AML1-ETO als auch GFP-M&M exprimierten, 39%. Dies entspricht einer vierfachen Zunahme der Apoptoserate (Fig.6a und b).

Beispiel 7 In Zellen ohne AML1-ETO werden MYB-abhängige Promotoren in vivo nicht von GFP-M&M reprimiert

Um zu zeigen, dass GFP-M&M in Abwesenheit von AML1-ETO die MYB-abhängigen Promotoren in vivo nicht reprimiert, wurden primäre Maus-Knochenmarkzellen mit GFP oder GFP-M&M retroviral transduziert. Hierdurch kam es in den GFP-positiven Zellen zu keinem signifikanten Unterschied in der Expression von KIT (Fig.7) und der Rate der Apoptose. Dies zeigt, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen keine spezifische Repression der Transkription von MYB-abhängigen Promotoren in gesunden Zellen induzieren.

Patentansprüche

1. Verbindung, die Bindungsaffinität für ein Tumor spezifisches Molekül aufweist und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann.
2. Verbindung gemäß ein Anspruch 1, in der die Dyslokalisation das Wachstum Tumor-spezifischer Zellen inhibiert.
3. Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2, in der die Dyslokalisation in Tumor-spezifischen Zellen Apoptose induziert.
4. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, die ein Peptid, Oligopeptid, Protein, Fusionsprotein, oder ein organisches Molekül mit einem Molekulargewicht von < 5000 , < 1000 oder < 500 ist.
5. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, in der das Tumor-spezifische Molekül ein Peptid, Oligopeptid, Protein, Fusionsprotein, RNA oder DNA ist.
6. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, die eine Bindungsaffinität in 10^{-5} - 10^{-12} , und besonders bevorzugt von 10^{-7} bis 10^{-9} aufweist.
7. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, in der das Tumor-spezifische Molekül in gesunden Zellen nicht oder in anderer Form vorliegt.
8. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, in der das Tumor-spezifische Molekül ein Fusionsprotein ist.

9. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, in der das Tumor-spezifische Molekül AML1-ETO ist.
10. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der das Tumor-spezifische Molekül eine DNA-Bindungsdomäne, ein Signalpeptid, Kinaseaktivität, Chromatinmodulatorische Eigenschaften, Protein-Proteininteraktionsdomänen oder Transkriptionelle Eigenschaften aufweist.
11. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, in der die Dyslokalisation das Tumor-spezifische Molekül an eine Nukleinsäuresequenz bindet, welche die Transkription eines Gens reguliert.
12. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, in der die Dyslokalisation das Tumor-spezifische Molekül an eine Nukleinsäuresequenz bindet, welche die Transkription eines Gens reguliert, wodurch die Transkription des Gens aktiviert oder inhibiert wird.
13. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, in der die Verbindung die Peptidsequenz der c-myb DNA-Bindungsdomäne umfaßt.
14. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, in der die Verbindung die Peptidsequenz der AML-1-Bindungs-domäne des "myeloid elf like factor" umfaßt.
15. Verbindung gemäß Anspruch 13 oder 14, in der die Verbindung die Peptidsequenz der c-myb DNA-Bindungsdomäne und die Peptidsequenz der AML-1-Bindungsdomäne des "myeloid elf like factor" umfaßt.
16. Verbindung gemäß Anspruch 15, in der die Verbindung die in SEQ ID NO: 1 gezeigte Sequenz aufweist.

17. Nukleinsäure, die für ein Peptid oder Protein gemäß einem der Ansprüche 2 bis 16 kodiert.
18. Nukleinsäure gemäß Anspruch 17, die eine DNA oder RNA ist.
19. Vektor, der eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18 umfaßt.
20. Wirtszelle, die eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18 oder einen Vektor gemäß Anspruch 19 aufweist.
21. Arzneimittel, das eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18, einen Vektor gemäß Anspruch 19 oder eine Wirtszelle gemäß Anspruch 20 umfaßt.
22. Arzneimittel gemäß Anspruch 21, das ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfaßt.
23. Arzneimittel gemäß Anspruch 21 oder 22, das zur oralen, intravenösen oder intramuskulären Verabreichung formuliert ist.
24. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18, eines Vektors gemäß Anspruch 19 oder einer Wirtszelle gemäß Anspruch 20 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren.
25. Verwendung gemäß Anspruch 24, wobei der Tumor Leukämie, insbesondere Akute Myeloische Leukämie ist.
26. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß einem der

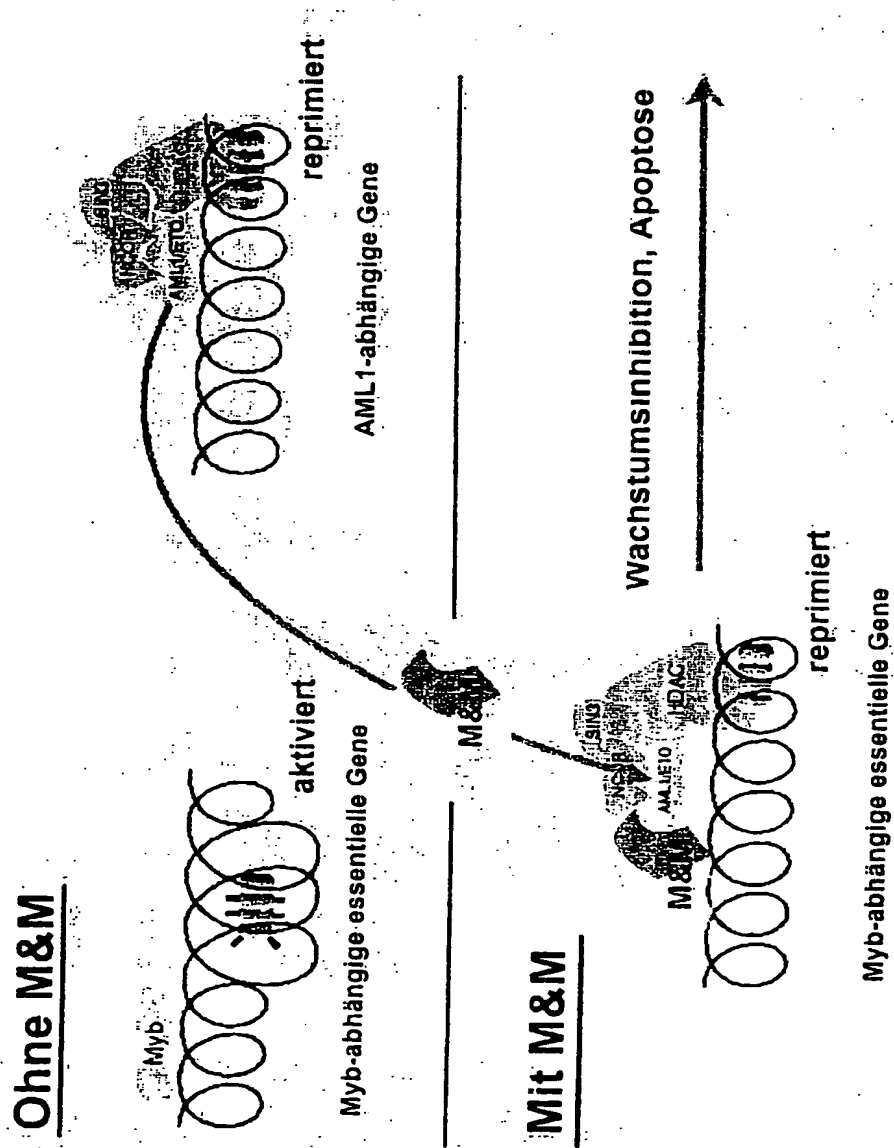
Ansprüche 1 bis 16, bei dem man das Peptid oder Protein rekombinant exprimiert oder durch Proteinsynthese gewinnt.

27. Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, die zur Behandlung von Tumoren geeignet ist, bei dem man:
 - (a) ein Tumor-spezifisches Molekül identifiziert;
 - (b) eine Verbindung identifiziert, die eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und eine Dyslokalisierung des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann.
28. Verfahren gemäß Anspruch 27, bei dem man solche Verbindungen identifiziert, in denen die Dyslokalisierung das Wachstum Tumor-spezifischer Zellen inhibiert oder in Tumor-spezifischen Zellen Apoptose induziert.
29. Verfahren gemäß Anspruch 27 oder 28, bei dem man das Tumor-spezifische Molekül mittels Microarray-Analysen, 2D-Proteingelelektrophoresen mit nachfolgender massenspektrometrischer Identifizierung oder einer Kombination der genannten Verfahren identifiziert.
30. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 27 bis 29, bei dem die Verbindung, welche eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und eine Dyslokalisierung des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann, ein Protein, eine RNA eine DNA oder eine organische Verbindung ist.
31. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 27 bis 30, bei dem man die Verbindung, welche eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und eine

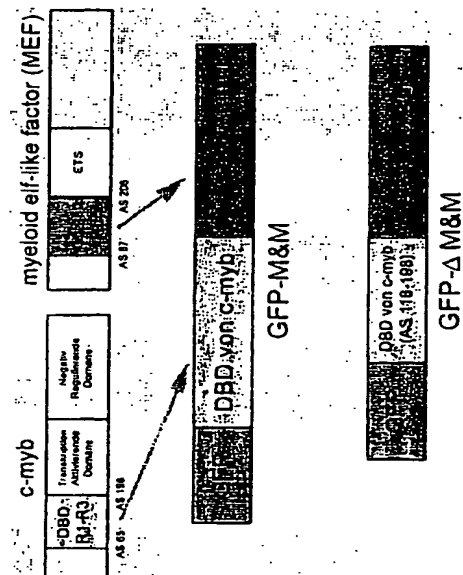
Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann, mittels Hochdurchsatz-Screening-Verfahren identifiziert.

32. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 27 bis 29, bei dem die Verbindung, welche eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann, aus zwei Teilen zusammengesetzt wurde.
33. Verfahren gemäß Anspruch 32, bei dem ein Teil der Verbindung eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und der zweite Teil die Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann.
34. Verfahren gemäß Anspruch 32 oder 33, bei dem die zwei Teile in getrennten Screening-Verfahren identifiziert werden.
35. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, Schritte umfassend, bei denen man:
 - (a) eine Verbindung, die zur Behandlung von Tumoren geeignet ist, mittels eines Verfahrens gemäß den Ansprüchen 27 bis 33 identifiziert;
 - (b) die Verbindung synthetisch oder rekombinant herstellt; und
 - (c) die Verbindung zu einem Arzneimittel formuliert.
36. Verfahren gemäß Anspruch 35, bei dem das Arzneimittel zur Behandlung von Tumoren, beispielsweise zur Behandlung von Leukämie und insbesondere zur Behandlung Akuter Myeloischer Leukämie geeignet ist.

FIGUR 1A



FIGUR 1B



FIGUR 1C

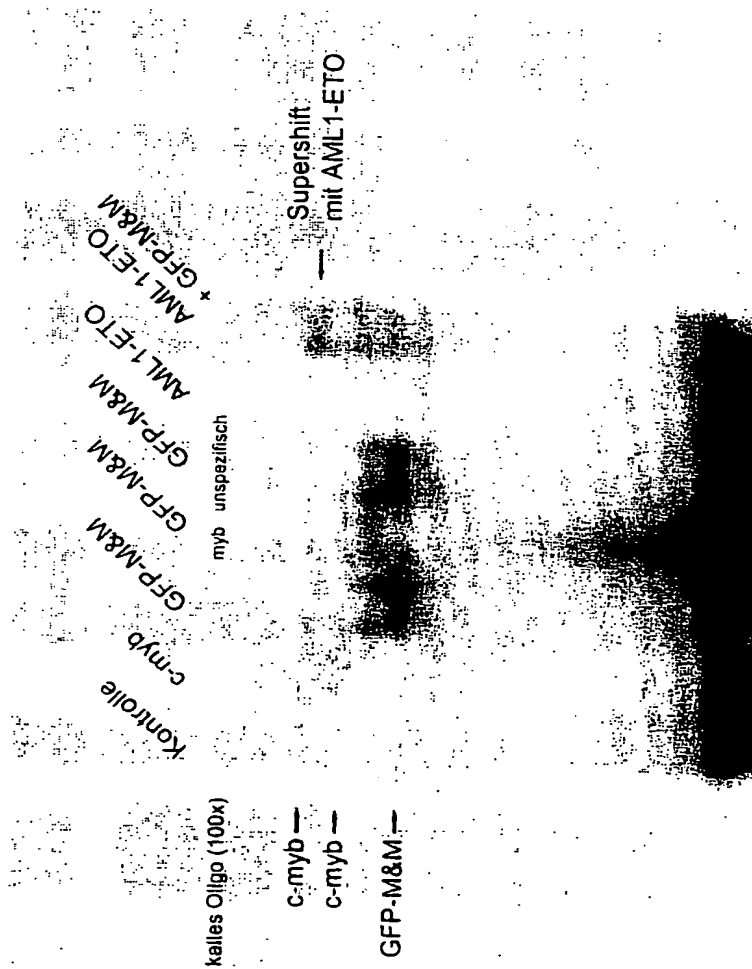
86 kD -

32 kD -

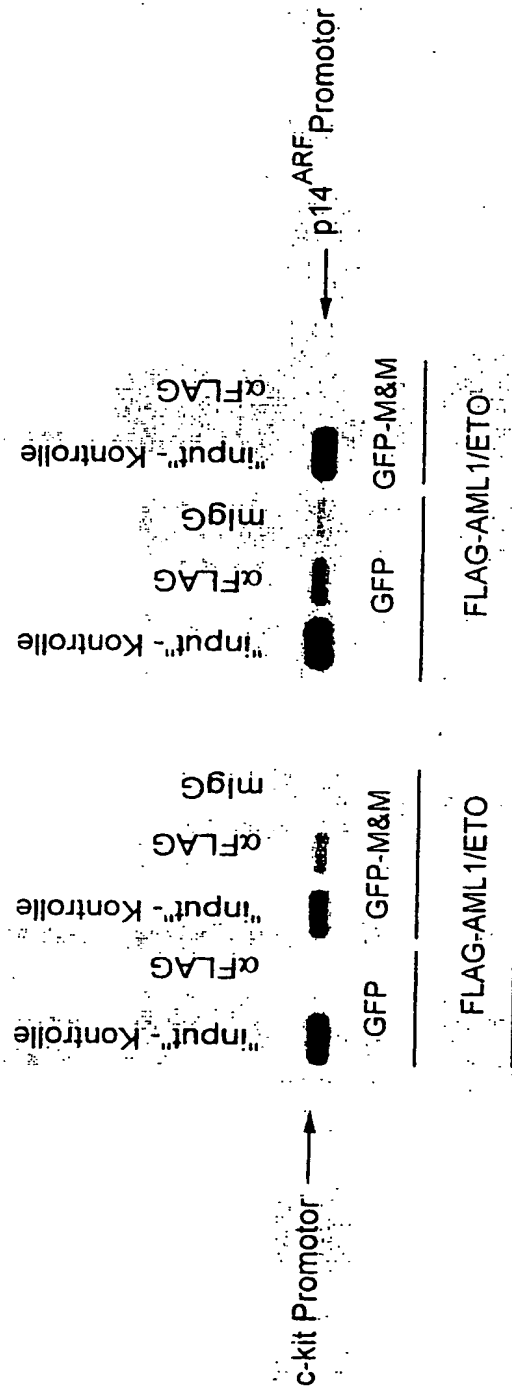
GFP
GFP-ΔM&M
GFP-M&M



FIGUR 2

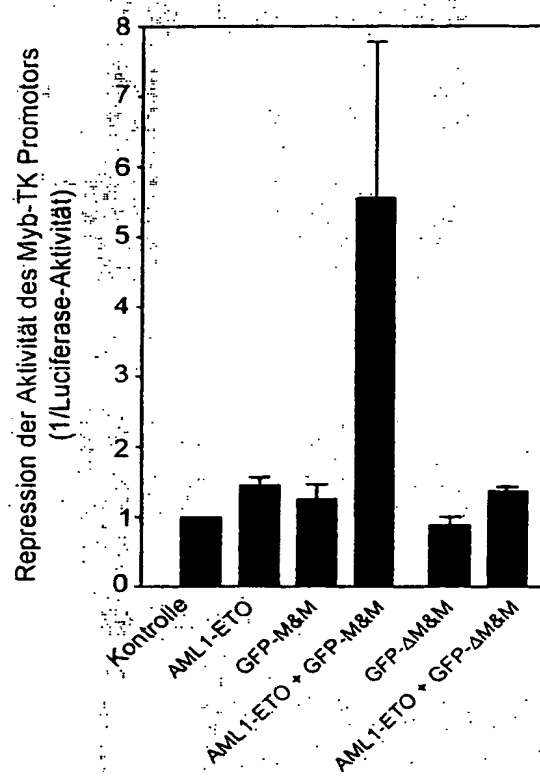


FIGUR 3

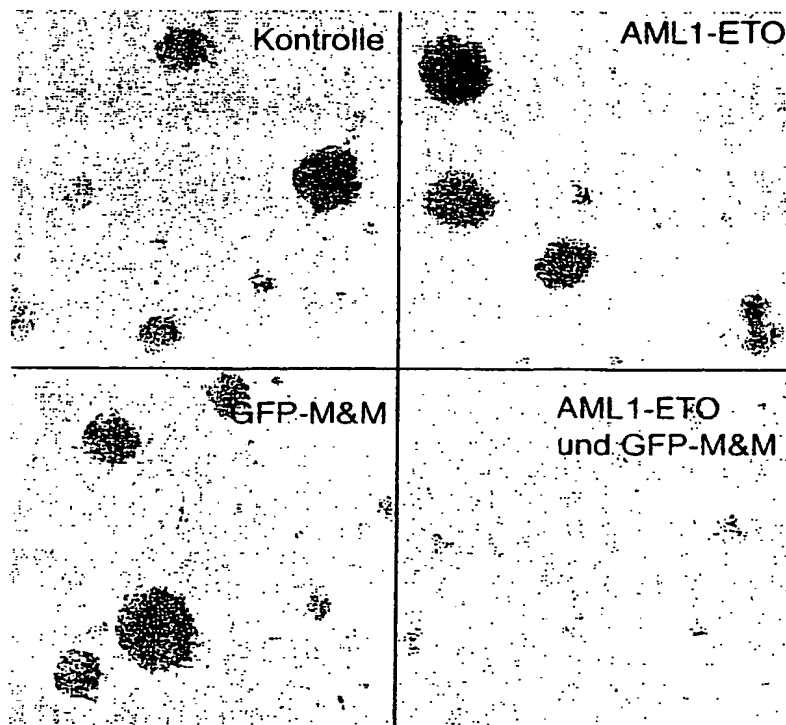


6/13

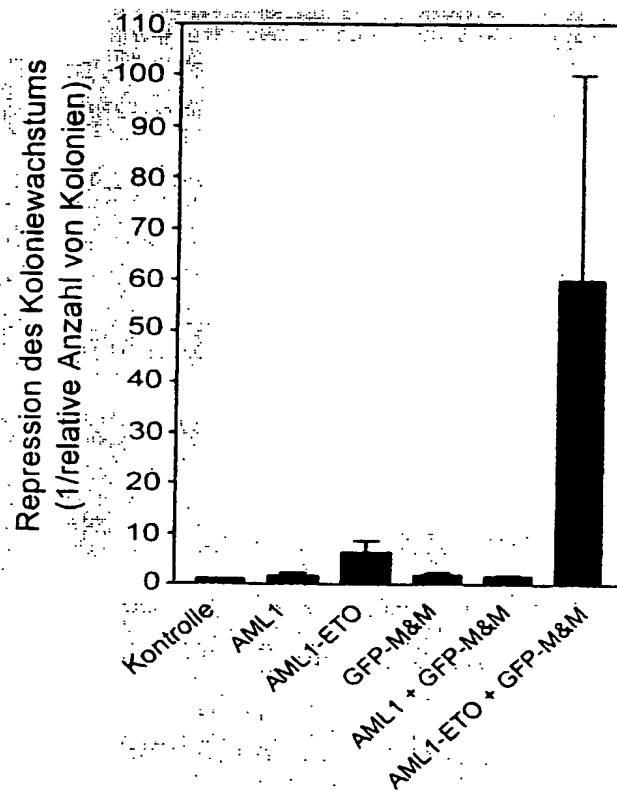
FIGUR 4



FIGUR 5A

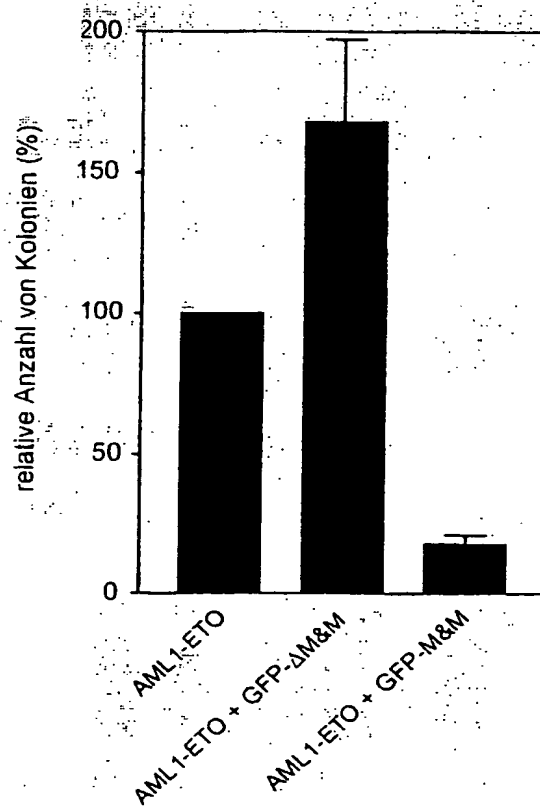


FIGUR 5B



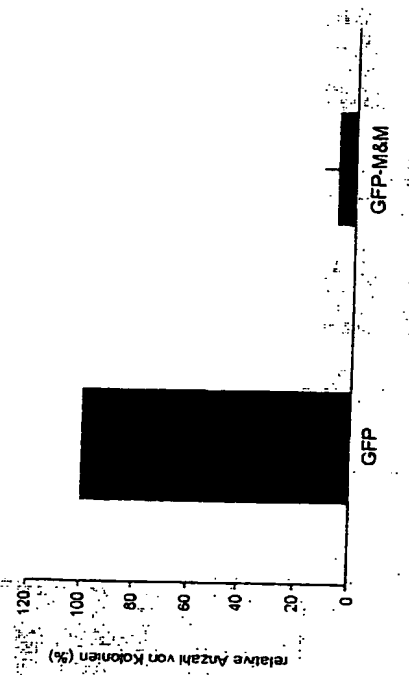
9/13

FIGUR 5C



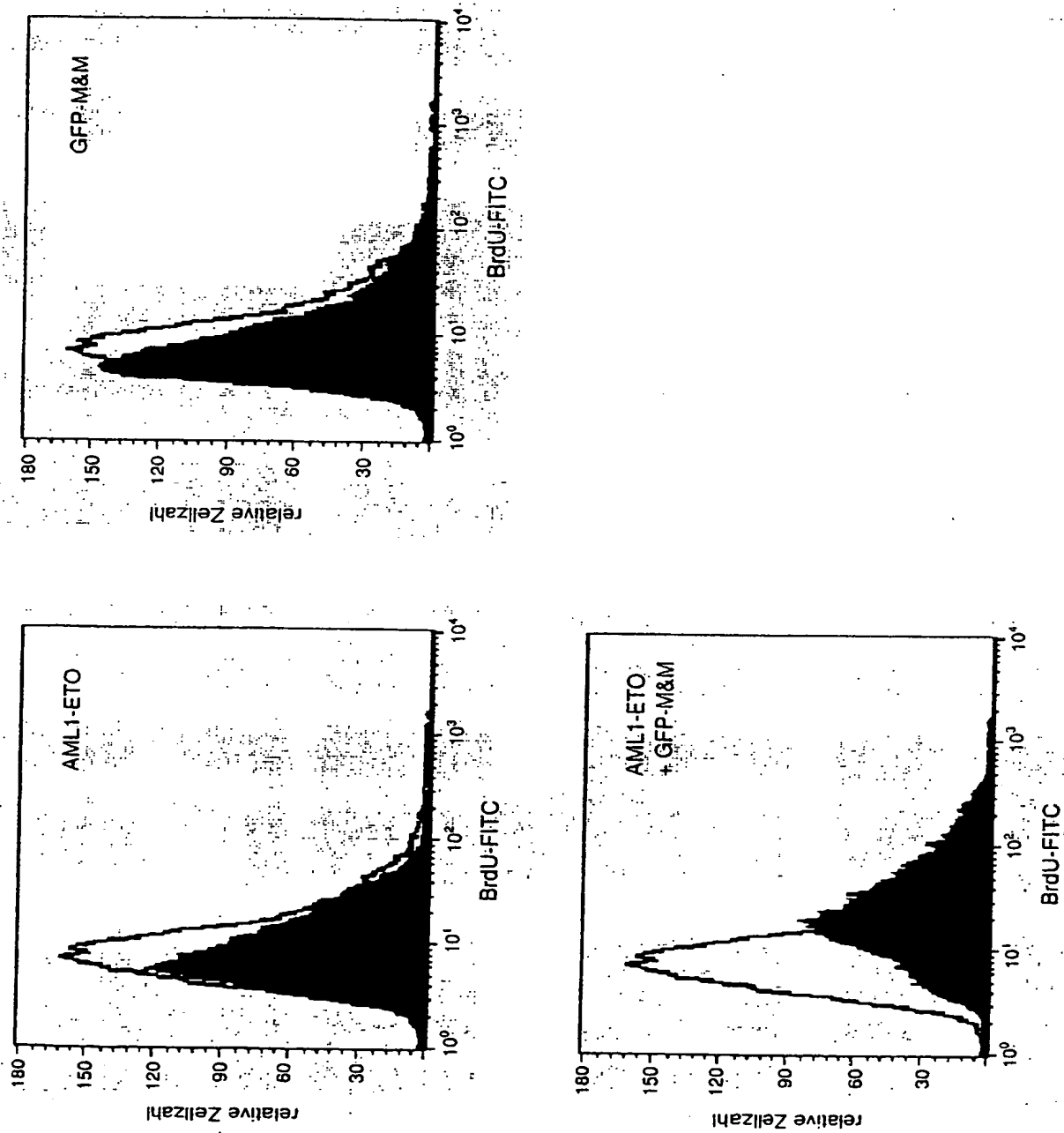
10/13

FIGUR 5D



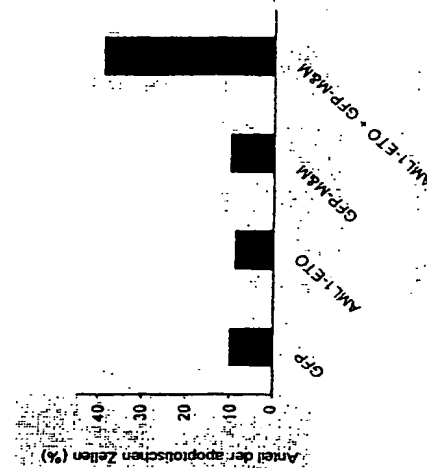
11/13

FIGUR 6A

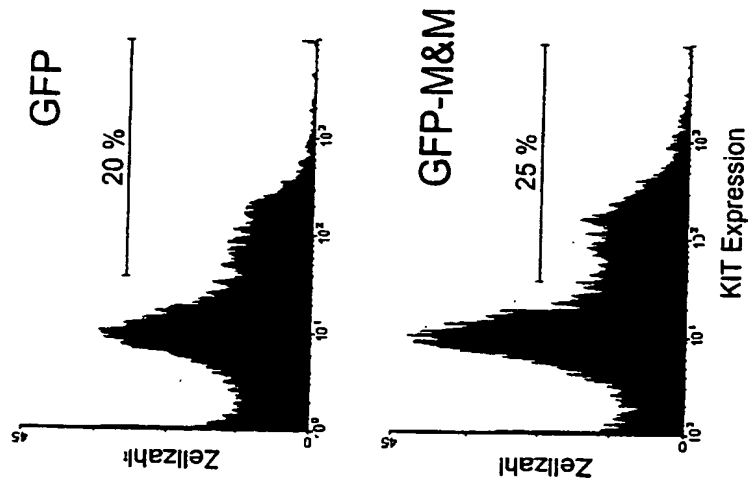


12/13

FIGUR 6B



Figur 7



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.